



RT-PCR Efficiency Analysis for BCL-2 Gene Using Saliva Samples

Fitri Sumiyati, Adri Nora, Henny Saraswati*

Prodi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jl. Arjuna Utara No.9, Jakarta Barat 11510, Indonesia

*Corresponding Author: hennysaraswati@esaunggul.ac.id

ABSTRACT

Cancer ranks as the second deadliest disease globally, with Indonesia in Southeast Asia bearing the highest number of cancer patients with fatalities. Cancer is characterized by uncontrolled cell division, often attributed to genetic mutations. One such mutation can occur in the BCL2 gene, pivotal in the apoptosis process. Research into the BCL2 gene expression levels in cancer patients is crucial for therapy development and cancer patient management. This study conducted an in-house RT-PCR efficiency test targeting the BCL2 gene. Saliva RNA samples from healthy individuals were used for the RT-PCR process. The RT-PCR results were visualized in standard curve format and analyzed using linear regression analysis with an R^2 value of 0.0778, indicating the lack of observable RT-PCR reaction efficiency. Based on these findings, the results are not reproducible enough across different personnel, timeframes, and sample sets.

Keywords: BCL2, PCR Efficiency, Real-Time PCR, Serial Dilution, Standard Curve.

Abstrak

Kanker merupakan penyakit yang mematikan nomor dua di dunia. Sedangkan di Asia Tenggara, Indonesia menjadi negara dengan jumlah pasien kanker dengan kematian tertinggi. Kanker ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali yang bisa disebabkan karena mutasi genetik. Salah satu mutasi gen ini bisa terjadi pada gen BCL2, yang berperan dalam proses apoptosis. Penelitian mengenai tingkat ekspresi gen BCL2 pada pasien kanker penting dilakukan untuk pengembangan terapi dan penanganan pasien kanker. Pada penelitian ini dilakukan uji efisiensi reaksi in-house RT-PCR terhadap gen BCL2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah RNA dari saliva orang sehat untuk proses RT-PCR. Hasil RT-PCR kemudian divisualisasikan dalam bentuk kurva standar dan dianalisis dengan analisis regresi linier² = 0.0778 yang didapatkan dari analisis ini menggambarkan belum nampak adanya efisiensi reaksi RT-PCR. Berdasarkan hasil ini dapat diasumsikan bahwa belum cukup *reproducible* jika dilakukan oleh tenaga, waktu dan sampel yang berbeda.

Kata Kunci: BCL2, Efisiensi PCR, Kurva Standar, Real-Time PCR, Serial Dilution.

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyebab kematian nomor dua di dunia dan Indonesia memiliki jumlah pasien kanker dengan kematian tertinggi di Asia Tenggara. Kanker terjadi akibat pembelahan sel yang tidak terkendali yang disebabkan oleh mutasi genetik. Salah satu faktor yang dapat menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkendali adalah overekspresi protein BCL2, yang berperan dalam

proses apoptosis [1]. Overekspresi protein ini mengganggu keseimbangan dalam tubuh dan berkontribusi pada pembentukan neoplasma, tumor, dan kanker.

Gen BCL-2 memainkan peran penting dalam proses apoptosis dengan melepaskan molekul pro-apoptosis ke sitosol dan pelepasan sitokrom C, yang kemudian menginduksi kematian sel. Regulasi yang tidak normal dari ekspresi Bcl-2 dapat menghambat

apoptosis dan terlibat dalam pembentukan berbagai jenis kanker.

Selain fungsinya sebagai pengatur proses apoptosis, gen BCL2 berpotensi digunakan sebagai biomarker dalam prognosis kanker [2]. Selain pencegahan dan pengobatan, prognosis kanker juga penting dalam manajemen penyakit kanker.

Metode yang dapat digunakan untuk prognosis kanker adalah dengan Real-time PCR [3, 4]. Dimana pada metode ini dapat dilihat tingkat ekspresi gen BCL2 yang sejalan dengan perkembangan penyakit kanker.

Namun demikian, metode Real-time PCR ini perlu dioptimalisasi terlebih dahulu untuk menghasilkan data yang valid. Salah satu hal yang perlu dilakukan dalam optimalisasi reaksi adalah dengan melihat efisiensi reaksi Real-time PCR.

Penelitian ini dilakukan untuk melihat efisiensi reaksi Real-time PCR yang telah dihasilkan sebelumnya. Sehingga dapat diketahui apakah reaksi yang telah didapatkan dapat menghasilkan data yang akurat.

METODE PENELITIAN

Subyek penelitian

Subyek penelitian merupakan orang sehat yang diketahui tidak sedang menderita kanker. Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Universitas Esa Unggul dengan mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dengan No.0922-08.019/DPKE-KEP/FINAL-EA/UEU/VIII/2022. Subyek diberikan penjelasan sebelum dilaksanakannya pengambilan sampel.

Pengambilan sampel saliva

Sebelum dilakukannya pengambilan sampel saliva, subyek diminta berpuasa selama \pm 3 jam. Setelah berpuasa, subyek akan berkumur dengan air mineral sebanyak 3 kali. Kemudian subyek diminta mengumpulkan salivanya sebanyak mungkin di dalam mulut, kemudian diludahkan ke dalam tabung 15 ml.

Isolasi RNA

Saliva yang dikumpulkan kemudian digunakan untuk prosedur isolasi RNA. Kegiatan ini dilakukan dengan Monarch® Total RNA Miniprep Kit (T2010S) (New England Biolabs, USA). Secara garis besar, saliva akan disentrifugasi sehingga sel-sel akan terpisah dari larutan. Kemudian sel-sel ini

akan dilisiskan dengan Lysis Buffer dan Proteinase K. Setelah itu, proses pemurnian akan dibantu dengan column sehingga bisa didapatkan RNA murni.

Sintesis cDNA

Molekul RNA yang berhasil diisolasi kemudian digunakan untuk sintesis cDNA. Proses sintesis ini menggunakan kit dan protokol SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit dari BioLine (USA). Komponen reaksi untuk sintesis cDNA adalah 4 ul RNA ditambahkan 4 ul 5x TransAmp Buffer, 1 ul enzim Reverse Transcriptase dan 11 ul Nuclease-free water, sehingga total volumenya adalah 20 ul. Siklus suhu yang digunakan adalah sebagai berikut : 25°C selama 10 menit, 42°C selama 15 menit dan 85°C selama 5 menit.

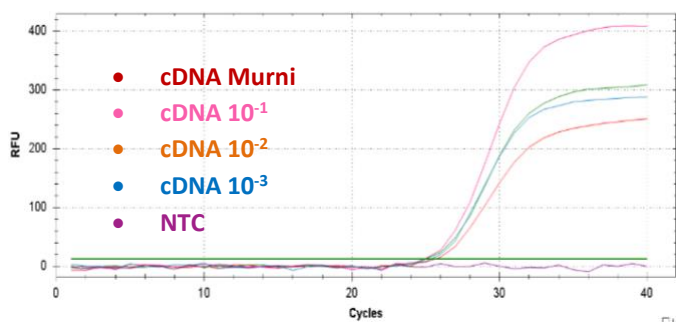
Real-time PCR

Real-time PCR dilakukan dengan cDNA menggunakan reagen SensiFAST™ SYBR® No-ROX (Bioline, USA). Komposisi reaksi adalah 10 ul 2x SensiFAST™ SYBR® No-ROX Mix, 0,8 ul primer forward (5'-GGATGCCTTTGTGG AACTGTA-3') dan 0,8 ul primer reverse (5'-CCAAACTGAGCAGAGTCTTCAG-3'), 4 ul template cDNA dan 4,4 ul Nuclease-free water (NFW). Sedangkan siklus suhu yang digunakan adalah 95°C selama 2 menit untuk aktivasi enzim polimerase, 95°C selama 5 detik untuk denaturasi, 60°C selama 10 detik untuk *annealing* dan 72°C selama 5 detik untuk ekstensi. Proses real-time PCR ini diulang sebanyak 40x. Setelah proses real-time PCR selesai, dilanjutkan dengan analisis Melting Curve dengan suhu 65-95°C selama 5 detik. Pada proses real-time PCR ini template cDNA mengalami pengenceran bertingkat dari 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} .

HASIL PENELITIAN

Kurva Amplifikasi

Kurva amplifikasi dibuat dari reaksi Real Time PCR. Di dalam kurva amplifikasi terdapat nilai Cq (*Quantification Cycle*) yang dihasilkan oleh reaksi Real Time PCR.



PCR. Garis warna yang berbeda menunjukkan perbedaan konsentrasi pengenceran yang digunakan. RFU : unit pengukuran yang digunakan dalam analisis yang menggunakan deteksi fluoresensi.

Kurva pada gambar 1 menunjukkan bahwa seluruh DNA sampel dapat teramplifikasi dengan dilusi yang berbeda. Dari keempat dilusi yang berbeda menggunakan sampel yang sama, menghasilkan nilai Cq yang berbeda. Nilai Cq dari ke empat sampel tersebut dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 : Nilai Cq dari reaksi Real-Time PCR

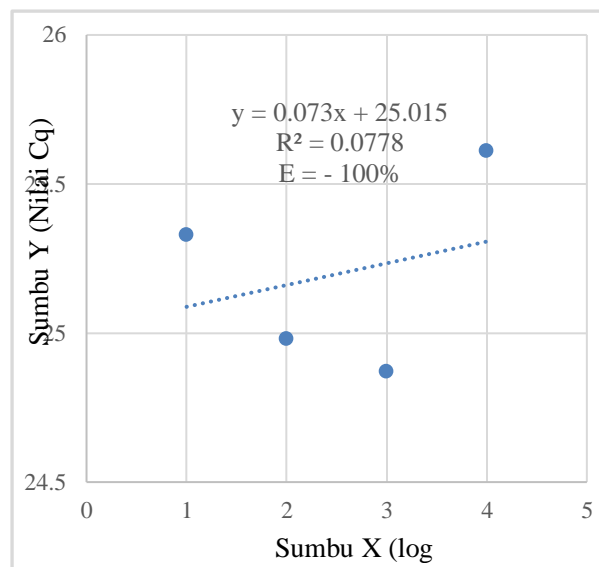
Tingkat Pengenceran	Nilai Cq (Quantification Cycle)
cDNA tanpa diencerkan	25,61
cDNA 10-1	24,87
cDNA 10-2	24,98
cDNA 10-3	25,33
NTC	N/A

Pada NTC (*Non Template Control*) tidak terbentuk pita DNA, hal ini terlihat pada grafik yang tidak terbentuk (datar) pada NTC. Dengan tidak terbentuknya grafik pada kurva NTC hal ini membuktikan bahwa tidak terjadi kontaminasi pada reaksi yang telah dilakukan.

Kurva Standar

Kurva regresi linier adalah kurva yang memvisualisasikan regresi linier. Regresi linier adalah metode statistik yang dipakai untuk menggambarkan hubungan linier antara variabel dependen (Y) dan independen (X). Dalam kurva ini nilai Cq sebagai variabel dependen dan konsentrasi pengenceran sebagai variabel independen. Kurva ini dibuat untuk melihat efisiensi dari reaksi Real Time PCR yang telah dioptimasi. Nilai efisiensi

menggambarkan tingkat sensitifitas suatu reaksi yang telah dioptimasi.



Hubungan ini dapat digambarkan dalam persamaan garis lurus :

$$Y = mx + b$$

Y = Variabel dependen

m = Kemiringan (slope)

b = Intercept (perpotongan dengan sumbu Y)

Di dalam kurva regresi linier termuat koefisien regresi yaitu (R^2), nilai dari koefisien determinasi adalah gambaran tentang besarnya nilai suatu hubungan antara variabel dependen dan independen. Nilai koefisien regresi berentang pada 0-1, jika nilainya mendekati 1 maka akan semakin baik hubungan antara kedua variabel tersebut. Berdasarkan hasil dari penelitian ini nilai koefisien determinasi (R^2) nya adalah 0,0778, hal ini dapat diartikan bahwa hubungan antara nilai Cq (Quantification Cycle) dengan log konsentrasi (pengenceran bertingkat) sebesar 7,7%. dengan diketahui nilai tersebut, maka belum dapat diterangkan hubungan antara nilai Cq dan pengenceran sampel. Hal ini dapat diasumsikan bahwa reaksi RT-PCR belum memiliki nilai efisiensi yang tinggi.

PEMBAHASAN

Gen BCL-2, yang termasuk dalam keluarga protein Bcl-2, memegang peran penting dalam

mengontrol proses apoptosis, atau kematian sel terprogram. Namun, ketika gen ini menjadi terlalu aktif atau "overekspresi", hal ini dapat menyebabkan berbagai penyakit serius seperti kanker, penyakit autoimun, dan gangguan neurodegenerative [5]. Overekspresi BCL-2 mendorong pertumbuhan sel yang tidak terkendali, yang merupakan ciri utama dari kondisi penyakit yang terkait dengannya [6].

Untuk menggali lebih dalam tentang peran gen BCL-2 dalam kesehatan dan penyakit, penelitian ini menggunakan sampel saliva sebagai sumber materi genetik. Pemilihan saliva sebagai sampel didasarkan pada kemudahan pengumpulan, sifat non-invasif, dan ketidaknyamanan yang minim bagi subjek penelitian. Selain itu, saliva juga telah terbukti memiliki potensi sebagai biomarker untuk berbagai masalah kesehatan manusia [7, 8].

Proses penelitian dimulai dengan isolasi RNA dari sampel saliva, yang kemudian diubah menjadi cDNA menggunakan teknik reverse transcriptase. Dilakukan pengenceran bertingkat pada cDNA untuk memastikan keberhasilan metode PCR yang telah dioptimalkan sebelumnya. Analisis dilanjutkan dengan real-time PCR untuk mengevaluasi tingkat ekspresi gen BCL-2 [9].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai Cq (cycle quantification) cDNA tanpa pengenceran lebih tinggi daripada nilai Cq cDNA yang telah diencerkan. Ini disebabkan oleh adanya inhibisi pada reaksi PCR, terutama oleh senyawa etanol yang berasal dari proses isolasi RNA [10, 11]. Meskipun begitu, hasil kurva regresi linier mengungkapkan efisiensi metode PCR yang mengkhawatirkan, dengan nilai sebesar -100%, yang menandakan kemungkinan hasil yang bervariasi tergantung pada kondisi sampel dan pengerjaannya.

Selain itu, penelitian ini juga mengidentifikasi beberapa batasan, termasuk kurangnya pengulangan (duplo/triplo) pada sampel yang menyebabkan variasi hasil yang besar. Validasi metode yang lebih ketat mungkin diperlukan untuk memastikan konsistensi hasil, dan diperlukan peningkatan dalam teknik isolasi RNA untuk mengurangi kemungkinan inhibisi.

Meskipun demikian, penelitian ini memberikan wawasan yang berharga tentang potensi penggunaan saliva sebagai sumber biomarker dalam penelitian kesehatan. Langkah-langkah berikutnya mungkin melibatkan perbaikan teknis untuk mengatasi tantangan yang dihadapi dan memastikan

akurasi serta konsistensi hasil dalam analisis ekspresi gen.

KESIMPULAN

Penelitian ini menemukan bahwa amplifikasi gen BCL 2 mencapai puncak pada siklus 25-26 dengan menggunakan 4 konsentrasi pengenceran yang berbeda. Pengenceran 10^{-1} menunjukkan hasil optimal dengan nilai Cq sebesar 24,7. Meskipun demikian, efisiensi amplifikasi masih rendah karena keberadaan inhibitor seperti etanol dalam sampel. Hal ini mengindikasikan perlunya penyesuaian metode atau penggunaan strategi tambahan untuk mengatasi hambatan tersebut dalam penelitian selanjutnya. Untuk mendapatkan cDNA yang bebas inhibitor, sebaiknya lakukan ekstraksi etanol setelah isolasi RNA. Penting untuk menjaga kebersihan dan kondisi aseptis selama proses Real Time PCR. Hal lain yang dapat dilakukan adalah menggunakan sampel dari pasien sakit karena memiliki ekspresi gen yang lebih tinggi, memudahkan pembacaan Real Time PCR dengan siklus yang lebih sedikit. Penelitian selanjutnya bisa difokuskan pada ekspresi gen BCL-2 pada pasien kanker, sebagai indikator deteksi sel kanker dalam tubuh manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Petrova, D., Borrás, J. M., Pollán, M., Lozano, E. B., Vicente, D., Moleón, J. J. J., & Sánchez, M. J. (2021). Public perceptions of the role of lifestyle factors in cancer development: Results from the spanish onco-barometer 2020. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19). <https://doi.org/10.3390/ijerph181910472>
- [2] Eimani, B. G., Sanati, M. H., Houshmand, M., Ataei, M., Akbarian, F., & Shakhssalim, N. (2014). Expression and Prognostic Significance of Bcl-2 and Bax in The Progression and Clinical Outcome of Transitional Bladder Cell Carcinoma. *CELL JOURNAL(Yakhteh)*, 15(4), 356–363.
- [3] Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/genes13122387>

- [4] Astuti, E. S. Y. (2018). *Peran Real Time Pcr Pada Deteksi Mikroba Severe Early Childhood Caries (S-ECC) (Suatu Tinjauan Artikel)*.
- [5] Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>
- [6] Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., & Scorilas, A. (2012). The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Advances in Hematology*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/524308>
- [7] Nur, A., & Yamamoto, Z. (2022). Saliva sebagai sumber DNA genom manusia. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 22(2), 126–134. <https://doi.org/10.24815/jks.v22i2.23266>
- [8] Arinawati, D. Y., & Widyawati, A. (2022). Saliva sebagai Media Diagnosis untuk Deteksi Keganasan. *STOMATOGNATIC - Jurnal Kedokteran Gigi*, 19(2), 77. <https://doi.org/10.19184/stoma.v19i2.34728>
- [9] Saaed, H. K., Mahmood, M. A., & Khoshnaw, N. (2017). Quantitative real time PCR analysis of apoptotic gene expression in chronic lymphocytic leukemia patients and their relationships with chemosensitivity. *Applied Cancer Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/s41241-017-0014-z>
- [10] Bessetti, J. (n.d.). An Introduction to PCR Inhibitor. *PCR Inhibition*.
- [11] Nugroho, K., Widyajayantie, D., Ishthifaiyyah, S. A., & Apriliani, E. (2021). Pemanfaatan Teknologi Droplet Digital PCR (ddPCR) dalam Kegiatan Analisis Molekuler Tanaman. *JURNAL BIOS LOGOS*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.35799/jbl.11.1.2021.31101>